Münster 1935 No 50 Phil DiSS

Chemie

Ueber das Carboligase-Problem

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Philosophischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Westfälischen Wilhelms-Universität Münster i. W.

vorgelegt von

Walter Schlockermann

aus Nordhorn (Kr. Wiedenbrück).

Buchdruckerei Thiele, Gütersloh i. Westf.

Chemie

Ueber das Carboligase-Problem

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Philosophischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Westfälischen Wilhelms-Universität Münster i. W.

vorgelegt von

Walter Schlockermann

aus Nordhorn (Kr. Wiedenbrück).

Buchdruckerei Thiele, Gütersloh i. Westf.

Tag der mündlichen Prüfung: 9. II. 35.

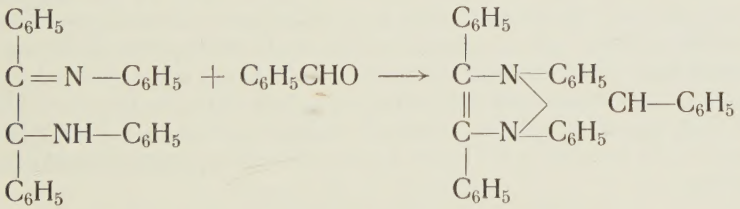
Dekan: Herr Prof. Dr. T r i e r.

Referent: Herr Prof. Dr. L a n g e n b e c k.

Korreferent: Herr Geheimrat Prof. Dr. S c h e n c k.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

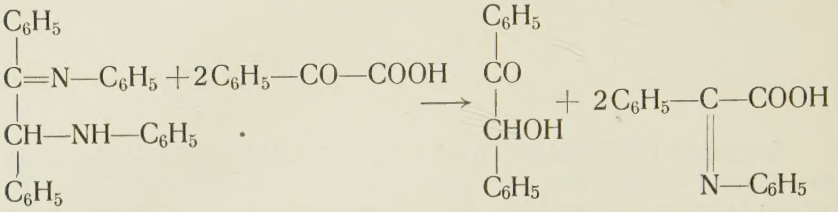
Im Jahre 1922 fanden Neuberg und J. Hirsch[1]) in der Hefe ein neues Ferment, das die Eigenschaft hatte, Kohlenstoffbindungen neu zu knüpfen. Sie machten die Beobachtung, daß bei der Vergärung von Brenztraubensäure neben Acetaldehyd und Kohlendioxyd auch Acetoin (Methyl-acetylcarbinol) $CH_3CHOH.CO.CH_3$ entsteht. Aus Hefe und Acetaldehyd allein bildet sich kein Acetoin. Die Acetoinmenge vergrößert sich beträchtlich beim Zusatz von Acetaldehyd. Neuberg und Hirsch gaben diesem neuen Ferment den Namen Carboligase, weil die Acyloinbildung in der Enzymchemie fast der einzige Fall ist, bei dem bei einer Fermentreaktion Kohlenstoffbindungen neu geknüpft werden. Nach von W. Dirscherl[2]) im Jahre 1931 gemachten Beobachtungen entsteht auch Acetoin aus Brenztraubensäure bei Gegenwart von Aminosäuren. Einige Zeit vorher, Ende 1930, fanden W. Langenbeck, R. Hutschenreuter und R. Jüttemann[3]), daß acyloinähnliche Stoffe als Nebenprodukte bei der Decarboxylierung von Phenylglyoxylsäure entstehen. Sie ließen Anilin auf Phenylglyoxylsäure einwirken. Hierbei entstand Benzaldehyd, Benzanilin, Kohlendioxyd und ein stickstoffhaltiges Nebenprodukt. Durch Synthese bewiesen sie dessen Konstitution. Es ließ sich durch Erhitzen von Benzoin-anil-anilid mit Benzaldehyd erhalten.



Hieraus folgerten sie, daß bei der katalytischen Spaltung von Phenylglyoxylsäure mit Anilin primär Benzoin-anil-anilid entsteht. Mit überschüssiger Phenylglyoxylsäure entsteht hieraus dann Benzoin.

---

[1]) Biochem. Z. 115. 282. (1921; J. Hirsch, Biochem. Z. 131. 178 (1922); C. Neuberg und O. Rosenthal, Ber. Chem. Ges. 57. 1436 (1924).
[2]) Hoppe-Seylers Z. 201. 92 (1931).
[3]) Liebigs Ann. 485. 53 (1931).



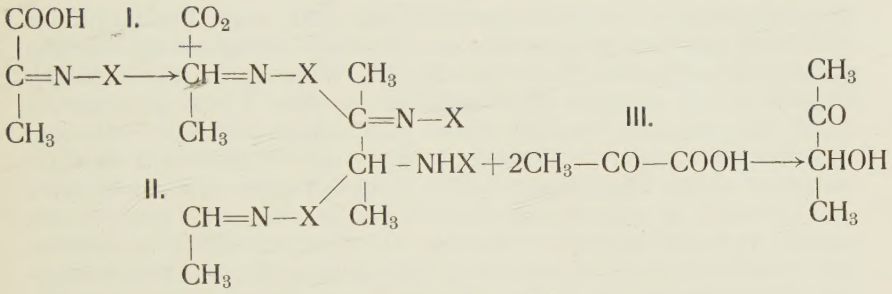
Mit Benzaldehyd entsteht durch Ringschluß ein Imidazolderivat (s. o.).

1930 hatte Dirscherl[4]) schon beobachtet, daß sich Brenztraubensäure durch „Ultraviolettes Licht" fast quantitativ in Kohlendioxyd und Acetoin spalten läßt. Da sich schon bei den einfachen Carboxylasemodellen, wie es die Aminosäuren sind, Acetoin bildet, ist es nicht ohne weiteres einzusehen, daß die Carboxylase zu der Acyloinbildung eines besonderen Hilfsfermentes der Carboligase bedarf, wie es Neuberg und Hirsch[5]) annehmen. Es wäre auch möglich, daß die Carboxylase allein die Acetoinbildung bewirkt, wie es W. Dirscherl[6]) und W. Langenbeck[7]) annehmen. Endlich wäre es möglich, daß sich zwei Moleküle Acetaldehyd, von denen eins in statu nascendi gegeben ist, direkt ohne Mitwirkung eines Enzyms zusammenlagern, daß also die Acyloinbildung nicht enzymatischer Natur ist. Auf jeden Fall muß das eine Molekül Acetaldehyd in statu nascendi sein, wie es Neuberg[8]) mit glykogenarmer Hefe gezeigt hat. Gewöhnliche Hefe bildet aus ihrem eigenen Glykogen etwas Aldehyd bzw. Acetoin.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, den Reaktionsmechanismus der biologischen Acyloinbildung aufzuklären. Wenn die Acyloinbildung sich so abspielt, daß die Carboxylase allein die Acetoinbildung bewirkt, und demnach die Carboxylase-Aldehyd-Verbindung in statu nascendi mit einem zweiten Molekül Enzym-Aldehyd-Verbindung oder mit dem fertigen Aldehyd reagiert[9]), kann man sich nach Langenbeck[10]) den Reaktionsverlauf folgendermaßen vorstellen:

---

[4]) Hoppe-Seylers Z. 188. 225 (1930); 201. 47, 78 (1931); 219. 177 (1933).
[5]) C. Neuberg u. J. Hirsch, Biochem. Z. 115. 282 (1921).
[6]) W. Dirscherl, Hoppe-Seylers Z. 201. 78 (1931).
[7]) W. Langenbeck, Ergebn. Enzymf. 2. 332 (1933).
[8]) C. Neuberg u. E. Simon, Biochem. Z. 156. 278 (1925).
[9]) W. Dirscherl, Hoppe-Seylers Z. 188. 234 (1930); W. Langenbeck, Ergebn. Enzymf. 2. 333 (1933); W. Dirscherl, Hoppe-Seylers Z. 219. 184 (1933).
[10]) W. Langenbeck, Ergebn. d. Physiologie 35. 496 (1933).



Diese Reaktionen sind durch Modellversuche [11]) verwirklicht. Hierbei ist angenommen, daß die Carboxylase ein primäres Amin ist (XNH_2). Dieses bildet mit Hilfe der Brenztraubensäure eine Iminosäure. Von dieser Iminosäure spaltet sich Kohlendioxyd ab. Das hierbei gebildete Aldehydimin lagert sich mit einem weiteren Molekül Aldehydimin, das sich in statu nascendi befindet, zusammen. Mit überschüssiger Brenztraubensäure entsteht dann hieraus das Acetoin. Das obige Schema deutet die Acetoinbildung durch die Carboxylase allein ohne die Carboligase. Die Reaktion spielt sich sehr wahrscheinlich nach diesem oder einem verwandten Schema ab. Bisher ist es allerdings in der Enzymchemie nicht beobachtet worden, daß ein Ferment zwei vollkommen voneinander verschiedene Reaktionen bewirkt. Die Entscheidung, ob es ein besonderes Ferment Carboligase gibt oder nicht, kann noch nicht endgültig gefällt werden; es ist aber sehr wahrscheinlich, daß die Carboxylase die Acyloinbildung mit bewirkt. Hierfür müssen zunächst noch weitergehende Reinigungsversuche gemacht werden. Um einen genauen Vergleich der entwickelten Kohlendioxydmengen und der Ausbeuten an Acetoin möglich zu machen, wurde ein neuer Begriff, der carboligatische Quotient CQ, eingeführt. Dies ist das Verhältnis der Anzahl Mole Acetoin zu der Anzahl Mole des in der gleichen Zeit gebildeten Kohlendioxyds.

$$CQ = \frac{\text{Anzahl Mole Acetoin}}{\text{Anzahl Mole gleichzeitig gebildetes } CO_2}$$

Der CQ-Wert ist von der Acetaldehydkonzentration abhängig. Wenn mehr Acetaldehyd zugesetzt wird, entsteht auch mehr Acetoin [12]). Das Verhältnis wird demnach bei zunehmender Acetaldehydkonzentration größer. Nun zeigte es sich bei dieser Arbeit, daß der CQ-Wert nicht allein von der Acetaldehydkonzentration abhängig ist, sondern daß die

[11]) W. Langenbeck a. a. O.
[12]) Biochem. Z. 115. 282 (1921); J. Hirsch, Biochem. Z. 131. 178 (1922); C. Neuberg u. O. Rosenthal, Ber. Chem. Ges. 57. 1436 (1924).

Konzentration der Brenztraubensäure ebenfalls großen Einfluß auf den CQ-Wert hat. Bei gleichbleibendem Volumen nimmt bei wachsender Brenztraubensäurekonzentration der CQ-Wert ab. Vorstehende Beobachtung ist mehrere Male bestätigt worden. Diese Erscheinung läßt sich mit der Annahme einer nicht enzymatischen Natur der Acetoinbildung nicht in Einklang bringen, da hierbei die Brenztraubensäure keine Rolle mehr spielt. Hierbei lagert sich ein Molekül Acetaldehyd im statu nascendi ohne Vermittlung eines Enzyms mit einem weiteren Molekül Acetaldehyd zusammen. Diese kinetischen Verhältnisse passen viel besser in das Schema der vorher erwähnten Arbeitshypothese. Bei größerer Brenztraubensäurekonzentration wird ein größerer Teil des Aldehydimins in die Iminosäure umgewandelt. Da nun aus zwei Molekülen Aldehydimin das Acetoin entsteht und die Iminosäure carboligatisch nicht wirksam ist, muß sich nach dem Schema bei einer größeren Brenztraubensäurekonzentration weniger Acetoin bilden. Die gleichen kinetischen Verhältnisse wurden bei den Carboxylasemodellen gefunden. Dirscherl [13]) machte die Beobachtung, daß sich aus Brenztraubensäure bei Gegenwart von Aminosäuren Acetoin bildet. Es lag nun nahe, auch hier den Einfluß der Brenztraubensäurekonzentration auf die Acetoinausbeute zu untersuchen. Hier wurde die gleiche Kinetik der Acyloinbildung wie bei der Carboxylase gefunden. Auch bei dem als Modell benutzten d—l Alanin[14]) nahm bei steigender Brenztraubensäurekonzentration die Acetoinausbeute und damit auch der CQ-Wert ab. Somit zeigte sich auch hier eine bemerkenswerte Analogie zwischen der Carboxylase und ihren Modellen.

Neubergs Annahme, daß die Carboligase ein besonderes Ferment ist, läßt sich nur beweisen, wenn weitgehendst gereinigte Enzymlösungen dargestellt werden, die eine Spaltung der Brenztraubensäure bewirken, aber kein Acetoin liefern. Bis jetzt ist dies noch nicht gelungen.

Für die vergleichenden Versuche dieser Arbeit war es nötig, eine genügend genaue Bestimmungsmethode für Acetoin bei Anwesenheit eines Acetaldehydüberschusses anzuwenden. Bei meinen Bestimmungen benötigte ich einen Acetaldehydüberschuß, da die Acetaldehydmenge bei den Versuchen durch den dabei entstehenden Acetaldehyd nicht wesentlich verändert werden durfte. Das Acetoin bestimmte ich nach der Methode von M. Lemoigne[15]), die von A. J. Kluyver und seinen Mitarbeitern H. J. L. Donker und

[13]) Hoppe-Seylers Z. 201. 92 (1931).
[14]) Dirscherl a. a. O.
[15]) C. r. Acad. Sci. 170. 131 (1920); 177. 652 (1932).

F. Visser't' Hooft[16]) verbessert und von C. B. van Niel[17]) auf ihre quantitative Verwendbarkeit untersucht wurde. Diese Methode ist allerdings nicht ganz quantitativ[18]). Van Niel fand 97% und Dirscherl im Durchschnitt von 25 Versuchen 85% des angewandten Acetoins wieder. Die Fehlerquelle liegt nach van Niel schon in der ersten Stufe bei der Oxydation des Acetylmethylcarbinols mittels Eisen-III-chlorid zu Diacetyl, während die Überführung des Diacetyls in Dimethylglyoxim und die Fällung des Dimethylglyoxims als Nickelsalz quantitativ verläuft. Außerdem hat sie noch die Fehlerquelle, daß überschüssiger Acetaldehyd die Ausfällung von Nickeldimethylglyoxim verhindert. Es bildet sich dabei ein Nickelkomplex und entsteht Acetaldoxim. Bei Versuchen mit kleinen Umsätzen fällt diese Fehlerquelle natürlich sehr ins Gewicht. Deshalb wurde das Diacetyldioxim-Acetaldoximgemisch bei Gegenwart von gelöstem Nickelsalz auf dem Wasserbade eingedampft. Das leicht flüchtige Acetaldoxim verdampft hierbei und das ausgefällte Nickeldimethylglyoxim bleibt dann zurück. Bei gleichbleibender Ausführung bietet diese Methode eine Gewähr für einen genügend genauen Vergleich der Ausbeuten an Acetoin. Es ist allerdings nicht ganz ausgeschlossen, daß auch bei dieser Bestimmungsart ein kleiner Bruchteil der Acetoinausbeute nicht erfaßt wird. Aber für die vergleichenden Messungen ist die Genauigkeit vollauf ausreichend. Die gefundenen CQ-Werte sind noch ziemlichen Schwankungen unterworfen. Irgendein Zusammenhang mit dem Reinheitsgrad der Enzymlösungen läßt sich nicht daraus erkennen.

Zur Acetoinbestimmung diente die bekannte Apparatur nach Freudenberg-Harder[19]). In den Destillierkolben dieser Apparatur füllte ich die Lösung von Ferment, Substrat, Acetaldehyd und Puffer ein. Der Kolben befand sich in dem gleichen Thermostaten, in dem die Warburg-Manometer geschüttelt wurden. Wenn sich fast die gesamte Menge CO_2 gebildet hatte, nahm ich den Destillationsapparat aus dem Thermostaten, fügte Eisen-III-chlorid zur Oxydation des Acetylmetyl-carbinols zu und begann die Destillation der Lösung, die ich in einer Vorlage, welche ich mit 3 ccm 10%iger Nickelsulfatlösung, 7 ccm 20%tigerHygroxylaminchlorhydratlösung und 15 ccm 20%iger Natriumacetatlösung beschickte, auffing. Nachdem $^2/_3$ des Kolbeninhalts überdestilliert waren, erhitzte ich die Vorlage ½ Stunde auf dem Wasserbad auf 80°. Den erkalteten Inhalt der Vorlage spülte ich quantitativ in eine Porzellanschale und dampfte ihn auf

[16]) Biochem. Z. 161. 361 (1925).
[17]) Biochem. Z. 187. 472 (1927).
[18]) Hoppe-Seylers Z. (W. Dirscherl) 188. 236 (1930).
[19]) Liebigs Ann. 433. 230 (1923).

dem Wasserbade zur Trockene ein. Den Rückstand nahm ich mit heißem Wasser, dem ich einige Tropfen Ammoniak zusetzte, auf und filtrierte das gebildete Nickeldimethylglyoxim in einem Glasfiltertiegel. Dann trocknete ich bei 110° konstant und brachte das Nickeldimethylglyoxim zur Wägung. Da auf diese Weise nur immer ein Versuch ausgeführt werden konnte, änderte ich die Methode später und füllte die Lösung von Ferment, Puffer, Substrat und Acetaldehyd in einen 100 ccm Meßkolben, den ich mit Puffer bis zur Marke auffüllte. Der Puffer befand sich in einem Vorratsgefäß im Thermostaten. Da ich für die Acetoinbestimmung 20 ccm Flüssigkeit und für die CO_2-Bestimmung 2 ccm benötigte, konnte ich nun je nach Bedarf eine bis vier Acetoinbestimmungen von der gleichen Enzymlösung ausführen. Ich nahm für jede Messung 20 ccm Flüssigkeit aus dem Meßkolben heraus und gab sie in den Destillierkolben der Freudenberg-Harder-Apparatur, in dem sich schon das Eisen-III-chlorid befand, und erhitzte den Kolben, bevor die eigentliche Destillation begann, 1/4 Stunde lang auf ungefähr 100°, ohne daß jedoch schon Flüssigkeit überdestillierte, um eine bessere Oxydation des Acetylmethylcarbinols zu erreichen.

Beim Destillieren entstanden Schwierigkeiten, da die Lösung stark schäumte. Nach dem Vorgange von Kluyver[20]) benutzte ich zunächst Oelsäure, um das Schäumen zu verhindern. Diese verstopfte aber schon bald die Poren des Sintertiegels und störte so erheblich beim Filtrieren des Nickeldimethylglyoximniederschlages. Nach Versuchen mit verschiedenen Hilfsmitteln erwies sich Cyclohexanol als für diesen Zweck geeignet. Durch Zugabe von 5 ccm Cyclohexanol zur Destillationsflüssigkeit wurde das Schäumen beseitigt und die Destillation ging einwandfrei vonstatten. Wenn das Cyclohexanol vollständig überdestilliert war, und die Lösung wieder zu schäumen begann, waren etwa 2/3 des Kolbeninhalts übergegangen. Nach der Destillation gab ich 20 ccm Aethylalkohol in die Vorlage, schüttelte gut durch und erzielte hierdurch eine homogene Mischung.

Leider war das Cyclohexanol, wie die Blindproben zeigten, häufig durch kleine Mengen von Aldehyden und Ketonen verunreinigt. Es erwies sich deshalb eine Reinigung des Cyclohexanols als notwendig, die sich durch einige Tage langes Schütteln mit Phenylhydrazin-p-sulfosäure und Sodalösung ausführen ließ. Das Cyclohexanol trennte ich im Scheidetrichter ab und destillierte es. Durch diese Behandlung war es von den oben erwähnten Verunreinigungen befreit worden. Da die Reinigung immer ziemlich umständlich und zeitraubend war, suchte ich zur Beseitigung des Schäumens

[20]) Kluyver a. a. O.

ein anderes Mittel. So erwies sich Octylalkohol (Methyl-hexyl-carbinol) als sehr wirksam. Nach Zugabe von 1,5 g Octylalkohol destillierte ich vorsichtig, bis der Alkohol vollkommen übergegangen war und die Lösung wieder zu schäumen begann. Nun vermischte ich den Inhalt der Vorlage zur Erzielung einer homogenen Mischung mit 25 ccm Methanol und erhitzte eine Stunde lang im siedenden Wasserbad. Die Weiterverarbeitung ging wie oben beschrieben vor sich.

Die für die Acetoinbestimmungen benötigten Enzymlösungen wurden folgendermaßen hergestellt. Von Fall zu Fall traf ich eine kleine Aenderung in der Behandlung und Weiterverarbeitung, über die im Versuchsteil berichtet wird. Als Ausgangsmaterial diente gewaschene und gepreßte Hefe der Hackerbräu A.-G., München, die auf die übliche Art zu Trockenhefe verarbeitet wurde. Die daraus durch Mazeration bei 30° erhaltenen Säfte versetzte ich unter guter Kühlung mit der Häfte ihres Volumens mit Methanol[21]) Hierauf gab ich 0,3 mol. Essigsäure zu und zwar 2 ccm auf 10 ccm Flüssigkeit. Durch $^1/_2$ Volumen zugesetzten Methanols wird der Gefrierpunkt des Wassers auf etwa —22° erniedrigt. Bei dieser tiefen Temperatur läßt sich die Carboxylase, wie es schon E. Auhagen[22]) fand, längere Zeit unverändert aufbewahren. Durch den Zusatz von Methanol bleibt nun die Enzymlösung bei den tiefen Temperaturen flüssig. Dadurch wird das Auftauen der Lösungen für die Messungen, das großen Zeitverlust verursacht, vermieden.

An die Fällung mit Methanol und Essigsäure schlossen sich meist Voradsorptionen an Kaolin und Tonerde an, durch die sich der größte Teil der Begleitstoffe entfernen ließ. Die so erhaltenen Lösungen wurden entweder bei -20° gegen 30%iges Methanol dialysiert oder an Tonerde adsorbiert und mit Phosphat-glyzerinlösung eluiert. Um für die Messungen die optimale Brenztraubensäurekonzentration zu finden, wurde die Aktivitäts-ps-Kurve der Carboxylase aufgestellt. Hierfür wurde ein Mazerationssaft aus Hefe der Münsterer Germania-Brauerei[23]) benutzt. Dieser Saft war 10-fach verdünnt und mit Kaolin geklärt worden. In den einzelnen Atmungströgen der Warburg-Barcroft-Apparatur wurden sämtliche Substratkonzentrationen gleichzeitig nebeneinander gemessen. Die einzelnen Atmungströge wurden mit 0,5 ccm Fermentlösung, 1,5 ccm 0,3 mol. Acetatpuffer (ph = 4,7) und 1—32 mg brenztraubensaurem Natrium beschickt. Das Maximum der Kurve (Fig. 1) wurde bei 2 mg brenz-

---

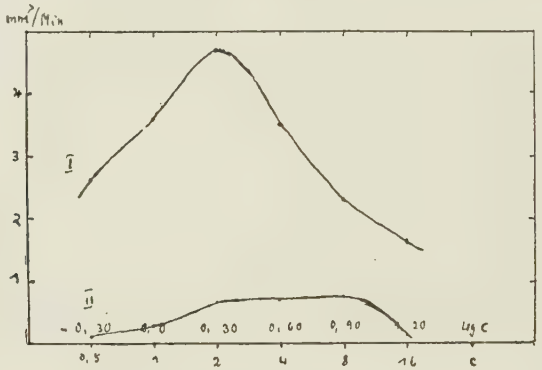
[21]) W. Langenbeck, R. Jüttemann, O. Schaefer, H. Wrede Hoppe-Seylers Z. 221. 2 (1933).

[22]) E. Auhagen, Hoppe-Seylers Z. 209. 20 (1932).

[23]) Der Germania-Brauerei Münster, insbesondere Herrn Dr. Hallermann, bin ich für die Überlassung größerer Hefemengen sehr zu Dank verpflichtet.

traubensaurem Natrium pro ccm gefunden. Der Manometerstand wurde alle 5 Minuten abgelesen.

Zum Vergleich stellte ich die Aktivitäts-ps-Kurve der Carboxylase mit Phenylglyoxylsaurem Kalium unter den gleichen Versuchsbedingungen auf. Hierbei wurde bei 8 mg phenylglyoxylsaurem Kalium ein Maximum erreicht.



c = mg Substrat ccm.

Figur 1:

Kurve I: Aktivitäts-ps-Kurve der Carboxylase mit brenztraubensaurem Natrium.

Kurve II: Aktivitäts-ps-Kurve der Carboxylase mit phenylglyoxylsaurem Kalium.

Versuchsteil.

Acetoinbestimmung.

Das Acetoin wurde nach der Methode von C. B. van Niel[24]) bestimmt, während das CO_2 gleichzeitig in der bekannten Warburg-Barcroft-Apparatur gemessen wurde. Die Lösung destillierte ich bei Gegenwart eines Überschusses von Eisen-III-chlorid. Das Destillat wurde in der Vorlage in einer Mischung von 3 ccm 10%iger Nickelsulfatlösung, 7 ccm 20%iger Hydroxylaminchlorhydratlösung und 15 ccm 20%iger Natriumacetatlösung aufgefangen. In einem 50 ccm Erlemeyerkölbchen vermischte ich 0,05 g brenztraubensaures Natrium mit etwa 20 ccm 0,3 mol. Acetatpuffer (ph = 5,3);

[24]) Biochem. Z. 187. 472 (1927).

in diese Mischung wurde 0,25 g frisch destillierter Acetaldehyd eingewogen und 5 ccm der zu messenden Fermentlösung zugegeben. 20 ccm dieser Lösung kamen in den Destillierkolben der Apparatur zur Acetoinbestimmung nach Freudenberg und Harder[25]) und 2 ccm in den Atmungstrog der Warburg-Barcroft-Apparatur zur CO_2-Bestimmung. Der Destillierkolben stand während der Versuchsdauer in demselben 20° Thermostaten, in dem sich das Warburg-Barcroft Manometer befand. Nachdem ungefähr die ganze Menge Brenztraubensäure vergoren war, wurde die Menge des entwickelten CO_2 gemessen und gleichzeitig 5 ccm 10% Eisen-III-chloridlösung in den Destillierkolben der Freudenberg-Harder-Apparatur gegeben.

Dann destillierte ich etwa $^2/_3$ des Kolbeninhalts in die Vorlage über und erhitzte diese $^1/_2$ Stunde im Wasserbad auf die Temperatur von 80°. Nach dem Erkalten wurde der Inhalt der Vorlage quantitativ in eine Porzellanschale gespült und zur Trockene eingedampft. Den Trockenrückstand nahm ich in heißem Wasser und einigen Tropfen Ammoniak auf und fitrierte das gebildete Nickeldimethylglyoxim in einem Schottschen Glasfiltertiegel G3 5/7 ab, trocknete es bei 110° konstant und brachte es zur Wägung. Beim Destillieren entstanden Schwierigkeiten durch Überschäumen, die durch Zugabe von 5 ccm Cyclohexanol behoben wurden, nachdem sich Oelsäure und andere Mittel als unwirksam erwiesen hatten. Vor der Destillation gab ich 5 ccm Cyclohexanol in den Kolben. Nach der Destillation wurden 20 ccm Aethylalkohol in die Vorlage gegeben, gut durchgeschüttelt und dann erst auf dem Wasserbad auf 80° erwärmt. Die Methode änderte ich später etwas. Nachdem ich das Eisen-III-chlorid hinzugegeben hatte, erhitzte ich den Kolben 3 bis 4 mal auf 100° und destillierte dann erst nach Zugabe der oben erwähnten 5 ccm Cyclohexanol. Da das Cyclohexanol durch geringe Mengen von Aldehyden und Ketonen verunreinigt war, reinigte ich es mit Phenylhydrazin-p-sulfosäure. 100 ccm Cyclohexanol wurden mit 2 g Phenylhydrazin-p-sulfosäure und 20 ccm 2 n Sodalösung 48 Stunden lang geschüttelt, im Scheidetrichter abgetrennt und destilliert.

Außerdem machte ich zu Beginn eines jeden Versuches eine Blindprobe, um zu sehen, ob die Ausgangsmaterialien frei von Acetoin waren.

Später wurde die Methode dahingehend abgeändert, daß ein 100 ccm Meßkolben anstatt des Destillierkolbens direkt in die Warburg-Barcroft Apparatur gebracht wurde. Damit hatte ich die Möglichkeit bekommen statt einer nun vier Messungen zu machen. Nun wurde die Acetoinbestimmung folgendermaßen ausgeführt:

---

[25]) Liebigs Ann. 433. 230 (1923).

In einem 50 ccm Erlemeyerkolben wurde 0,1 g brenztraubensaures Natrium eingewogen, etwa 20 ccm 0,3 mol. Acetatpuffer (ph = 5,3) zugesetzt und in diese Lösung 1 g frisch destillierter Acetaldehyd eingewogen. Die Brenztraubensäurelösung wurde täglich frisch angesetzt.

Ferner wurden 25 ccm Fermentlösung in einen 100 ccm Meßkolben eingefüllt. Die beiden Kölbchen wurden dann verschlossen und eine halbe Stunde in einen Thermostaten von 20° gebracht. Dann wurde die Lösung von brenztraubensaurem Natrium, Acetaldehyd und 0,3 mol. Acetatpuffer im Meßkolben mit der Fermentlösung vermischt, mit 0,3 mol. Acetatpuffer (ph = 5,3) nachgespült und mit demselben Puffer auf 100 ccm aufgefüllt und umgeschüttelt. Der Puffer befand sich dauernd in einem Vorratsgefäß in dem 20° Thermostaten.

2 ccm dieser Lösung brachte ich sofort in den Atmungstrog der Warburg-Barcroft Apparatur zur Messung der sich entwickelnden Menge CO_2. Alle Messungen wurden bei 20° ausgeführt.

Von 20 ccm dieser Lösung machte ich eine Blindprobe für die Acetoinbestimmung. Die Zeit wurde von dem Augenblick des Zusammenmischens von Fermentlösung und der Lösung von brenztraubensaurem Natrium, Puffer und Acetaldehyd an gemessen. Zunächst schüttelte ich 5 Minuten zum Temperaturausgleich. Die Messungen wurden auf den Beginn der Reaktion extrapoliert. Wenn fast die ganze Brenztraubensäure vergoren war, begann ich mit der Acetoinbestimmung.

Aus dem im Thermostaten stehenden 100 ccm Meßkolben wurden 20 ccm Flüssigkeit abpipettiert und in eine Apparatur zur Acetoinbestimmung nach Freudenberg-Harder gebracht. Im Destillierkolben befanden sich 5 ccm 10%ige Eisen-III-chloridlösung. Das Destillat fing ich in einer Vorlage, in der sich 3 ccm 10%iges Nickelsulfat, 7 ccm 20%ige Hydroxylaminchlorhydratlösung und 15 ccm 20%ige Natriumacetatlösung befanden, auf.

Zunächst wurde der Destillierkolben auf etwa 100° ¼ Stunde lang erhitzt, ohne daß jedoch in der ersten viertel Stunde etwas Flüssigkeit überdestillierte. Vor der Destillation gab ich noch 1,5 ccm sekundären Octylalkohol (Methylhexylcarbinol) in den Destillierkolben, um das Ueberschäumen zu verhindern. Nach der Destillation wurden 25 ccm Methylalkohol in die Vorlage gegeben, damit eine homogene Mischung entstand. Dann erhitzte ich eine Stunde im siedenden Wasserbade auf 80°. Nach dem Erkalten spülte ich den Inhalt der Vorlage wiederum quantitativ in eine Porzellanschale und dampfte ihn auf dem Wasserbade zur Trockene ein. Dann wurde der Trockenrückstand in heißem Wasser, dem einige Tropfen Am-

moniak zugesetzt worden waren, gelöst und das gebildete Nickeldimethylglyoxim im Glassintertiegel zur Wägung gebracht.

Aus der gebildeten Menge CO_2 und der in der gleichen Zeit gebildeten Menge Acetoin berechnete ich dann C.Q. d. h. das Verhältnis der Anzahl Mole Acetoin zu der Anzahl Mole gleichzeitig gebildetes CO_2. Da ich zu der CO_2-Bestimmung in der Warburg-Barcroft-Apparatur nur den zehnten Teil der Flüssigkeitsmenge, die zu der Acetoinbestimmung benötigt wurde, benutzte, mußten bei der Berechnung die erhaltenen CO_2-Werte natürlich noch mit 10 multipliziert werden.

Abhängigkeit der Acetoinausbeute von der Konzentration der Brenztraubensäure.

Nr.	Macerationssaft	Std.	Brenztraubensaures Natrium in 100 ccm in g.	CO_2 in ccm	Acetoin in mg.	CQ
1a		4	0,1	4,2	2,75	0,16
b		4	1,0	6,9	0,49	0,02
2a		11	0,1	3,7	3,1	0,21
b		11	1,0	5,4	1,9	0,09
3a	Rohsaft	5	0,1	3,5	4,7	0,34
b	mit Methanol	5	1,0	2,5	1,1	0,11
4a	und Essigsäure	3½	0,1	1,8	2,0	0,28
b		4½	0,1 [1])	2,2	2,5	0,28
5a	2 mal mit Kaolin	3½	0,1	2,7	2,0	0,14
b	voradsorbiert	5¾	1,0	2,9	0,63	0,05
c		3¾	0,1	2,6	2,4	0,18

1) Bei dem Versuch 4b wurden nachträglich vor der Destillation 0,2 g brenztraubensaures Natrium zugesetzt, um zu prüfen, ob das Acetoin durch die höhere Brenztraubensäurekonzentration zersetzt wurde. Dies war aber nicht der Fall.

Die Acetoinausbeute im Modellversuch.

Folgende Versuche zeigen die Abhängigkeit der Acetoinausbeute im Modellversuch von der Konzentration der Brenztraubensäure. Für die Versuche wurden kleine Rohre aus schwer schmelzbarem Glase von etwa 3 mm Stärke benutzt. Diese Reaktionsgefäße waren an einer Seite zugeschmolzen. An der anderen Seite war ein 150 mm langes und 7 mm dickes Rohr aus demselben Material angeschmolzen. Sie hatten eine Länge von 60 mm und einen äußeren Durchmesser von 25 mm. In das Rohr I kam dann 1 ccm einer Lösung von 5 ccm reinstem Eisessig, 0,5 ccm frisch destilliertem Acetaldehyd und 1,0 g d-l-Alanin und 4 ccm einer Lösung von

5 ccm Eisessig und 5 g reiner kristallisierter Brenztraubensäure. Rohr II bekam folgende Füllung: 1 ccm einer Lösung von 5 ccm Eisessig, 0,5 ccm frisch destilliertem Acetaldehyd und 0,1 g d-l-Alanin und 4 ccm einer Lösung von 5 ccm Eisessig und 0,25 g Brenztraubensäure. Nach dem Zuschmelzen beider Rohre, wobei die Enden zu Kapillaren ausgezogen wurden, wurden sie in ein siedendes Wasserbad gehängt und darin zwei Stunden lang erhitzt. Auf das ausgezogene Ende des ersten Rohres wurde daraufhin ein kapillarer Druckschlauch geschoben, dessen anderes Ende mit dem geöffneten Hahn eines Quecksilbereudiometers verbunden war. Der Quecksilberspiegel wurde auf Atmosphärendruck eingestellt. Nachdem nun die Kapillare innerhalb des Druckschlauches abgebrochen worden war, konnte das gebildete Kohlendioxyd in das Eudiometer entweichen. Dann schüttelte ich die Reaktionsgefäße, damit ein vollständiger Gasaustausch stattfinden konnte. Hierbei wurde der Quecksilberspiegel des Eudiometers ständig auf Atmosphärendruck eingestellt. Dann ließ man das Eudiometer 30 Minuten zum notwendigen Temperaturausgleich stehen. Hierauf konnte ich das Volumen des sich bei dem Versuch gebildeten Kohlendioxydes ablesen. In der gleichen Weise behandelte ich beide Rohre, deren Inhalt ich quantitativ mit Wasser in die gleiche Apparatur, wie sie bei den Fermentversuchen benutzt wurde, spülte. Dann wurde genau so destilliert, wie es bei der Acetoinbestimmung beschrieben wurde. Der Zusatz von Octylalkohol erübrigte sich allerdings, da keine Destillationsschwierigkeiten durch Schäumen entstanden. Wie die Blindversuche ohne Ferment mit den einzelnen Ausgangsmaterialien allein zeigten, waren diese frei von Acetoin.

Versuchsergebnisse.

Wie die Versuchsergebnisse zeigen, ist auch hier bei den Modellversuchen analog den Fermentversuchen die Acetoinausbeute von der jeweiligen Konzentration der Brenztraubensäure abhängig und zwar wird sie bei steigender Brenztraubensäurekonzentration kleiner. Die gleiche Erscheinung wurde bei der Carboligase beobachtet.

Rohr I. (viel Brenztraubensäure): 83,4 ccm CO_2 (22°, 750 mm), 1,5 g Nickeldimethylglyoxim. C.Q. = 0,003.

Rohr II: (wenig Brenztraubensäure): 20,2 ccm CO_2 (22°, 750 mm) 2,3 g Nickeldimethylglyoxim. C.Q. = 0,0020.

Es wurde davon abgesehen, den Dampfdruck des Eisessigs und des Acetaldehyds und die Löslichkeit des Kohlendioxyds in Rechnung zu stellen. Da es nur auf den Vergleich ankam, konnten diese Größen vernachlässigt werden.

Die für die Versuche benötigten Mazerationssäfte wurden aus reiner Brauereihefe der Hackerbrauerei [26]), München, hergestellt. Sie wurde gewaschen und gepreßt von der Brauerei bezogen. Aus dieser gepreßten Hefe bereitete ich in der üblichen Weise Trokkenhefe. Sie wurde durch ein Drahtsieb (5 mm) gepreßt, an einem luftigen Ort auf Papier ausgebreitet und getrocknet, was je nach Witterung und Temperatur 4—8 Tage in Anspruch nahm. Diese Trockenhefe konnte, wenn sie trocken und einigermaßen kühl gelagert wurde, 2—3 Monate aufbewahrt werden, ohne ihre Wirksamkeit erheblich einzubüßen. Hieraus stellte ich die Mazerationssäfte folgendermaßen her:

Einen Teil der eben erwähnten Trockenhefe rührte ich mit 3 Teilen Wasser zu einem dicken Brei an und mazerierte ihn 3 Stunden lang in einem Thermostaten von 30°. Aus dieser Lösung wurde dann durch Zentrifugieren der Rohsaft gewonnen.

Später änderte ich das Verfahren etwas und erhöhte die Mazerationsdauer auf 4—5 Stunden. Außerdem wurde die Trockenhefe nur mit der eineinhalbfachen Menge Wasser angerührt. Die restlichen eineinhalb Teile Wasser fügte ich erst vor dem Zentrifugieren hinzu. Den Hefebrei rührte ich während der Mazerationsdauer mehrmals mit einem Glasstab um. Nachdem der Rohsaft von dem Hefebrei abgegossen worden war, wurde der Hefebrei nochmals mit der dreifachen Menge Wasser (auf die ursprüngliche Menge Trockenhefe bezogen) gewaschen. Dann zentrifugierte ich nochmals. Die beiden Portionen Rohsaft wurden nun zusammengegeben und mit der Hälfte ihres Volumens mit Metlanol [27]) versetzt. Das Hinzugeben des Methanols erfolgte unter guter Kühlung; hierbei fiel schon ein Teil des Eiweißes aus. Durch Zugabe von 2 ccm 0,3 mol. Essigsäure auf je 10 ccm des Gesamtvolumens wurde ein weiterer Teil Eiweiß gefällt. Dann bewahrte ich die Lösung in einer Eis-Chlorcalciumkältemischung bei —22° auf. In der Kälte fiel ein weiterer Teil des Eiweißes aus. Später stand mir eine elektrische Kühlmaschine[28]) zur Verfügung, durch die ich eine Solemenge von 250 Litern automatisch auf einer Temperatur von —17° bis —22° halten konnte. Dadurch konnten größere Rohsaftmengen verarbeitet werden. Ein Teil der Acetoinbestimmungen wurde mit den auf die vorhin erwähnte Art bereiteten Rohsäften gemacht, während ein anderer Teil mit gereinigten Hefesäften ausgeführt wurde. Die Messungen führte

[26]) Der Hackerbrauerei München danke ich bestens für die Überlassung von reiner gewaschener Brauerei-Unterhefe.

[27]) W. Langenbeck, R. Jüttemann, O. Schaefer, H. Wrede, Hoppe-Seylers Z. 221. 2 (1933).

[28]) Der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft bin ich für die großzügige Überlassung der elektrischen Kühlanlage zu größtem Dank verpflichtet.

ich ohne Hefekochsaft aus, da durch einen Zusatz von Hefekochsaft keine wesentliche Aktivierung stattfand. Kleinere Mengen Mazerationssaft zentrifugierte ich in gläsernen Zentrifugierrohren, während ich für größere Flüssigkeitsmengen eine verbleite Stahlwanne benutzte. Da die Schwermetalle starke Fermentgifte sind, wurde die Zentrifugierwanne mit einem Schutzüberzug von in Methanol unlöslichem schwarzem Asphaltlack versehen. Die zuerst benutzten Anstriche mit Zelluloselack hatten keine große Lebensdauer.

Versuch 1

3 Stunden mazerierter Rohsaft wurde mit der Hälfte seines Volumens mit Methanol versetzt. Hierauf gab ich 0,3 mol. Essigsäure zu und zwar auf je 10 ccm Flüssigkeit 2 ccm Essigsäure.

Versuchsdauer: 18 Stunden 30 Minuten.

Das Wasser wurde vor dem Mazerieren auf einmal hinzugegeben.

Es wurden 231,4 ccmm CO_2 und 3 mg Nickeldimethylglyoxim = 1,8 mg Acetoin gebildet.

CQ = 0,20

Versuch 2.

3 Stunden mazerierter Rohsaft wurde mit der Hälfte seines Volumens mit Methanol versetzt. Hierauf gab ich 0,3 mol. Essigsäure zu und zwar auf je 10 ccm Flüssigkeit 2 ccm Essigsäure. Die Trockenhefe rührte ich nur mit der eineinhalbfachen Menge Wasser an. Die restlichen eineinhalb Teile Wasser fügte ich erst vor dem Zentrifugieren hinzu.

Es wurden zwei Versuchsreihen, eine mit 0,1 g brenztraubensaurem Natrium und eine mit 1 g brenztraubensaurem Natrium gemessen.

Reihe I. (0,1 g brenztraubensaures Natrium). Versuchsdauer: 14 Stunden. Es bildeten sich 372 ccmm CO_2 und 5,4 mg Nickelmethylglyoxim = 3,3 mg Acetoin.

CQ = 0,21

Reihe II. (1 g brenztraubensaures Natrium). Versuchsdauer: 11 Stunden. Es wurden 540 ccmm CO_2 entwickelt und 3,2 mg Nickeldimethylglyoxim = 2 mg Acetoin gebildet.

CQ = 0,09

Bei größerer Brenztraubensäurekonzentration nimmt die Acetoinausbeute ab.

Versuch 3.

3 Stunden mazerierter Rohsaft wurde mit der Hälfte seines Volumens mit Methanol versetzt. Hierauf gab ich 0,3 mol. Essigsäure zu und zwar auf je 10 ccm Flüssigkeit 2 ccm Essigsäure. Die Trokkenhefe rührte ich nur mit der eineinhalbfachen Menge Wasser an. Die restlichen eineinhalb Teile Wasser fügte ich erst vor dem Zentrifugieren hinzu. Es wurden wiederum zwei Versuchsreihen gemessen und zwar beide mit 0,1 g brenztraubensaurem Natrium. Bei der zweiten Reihe setzte ich nachträglich vor dem Destillieren noch 0,2 g brenztraubensaures Natrium zu, um zu prüfen, ob das Acetoin durch die höhere Brenztraubensäurekonzentration etwa zersetzt wurde. Das war jedoch nicht der Fall.

Reihe I. (0,1 g brenztraubensaures Natrium). Versuchsdauer: 18 Stunden 20 Minuten. Es entwickelten sich 300 ccmm CO_2. Die Acetoinausbeute betrug 2,6 mg, da sich 4,2 mg Nickeldimethylglyoxim bildeten.

CQ = 0,22

Reihe II. (0,1 g brenztraubensaures Natrium). Versuchsdauer: 20 Stunden 10 Minuten. Es wurden 299,5 ccmm CO_2 und 4,2 mg Nickeldimethylglyoxim = 2,6 g Acetoin gebildet.

CQ = 0,22

Der CQ-Wert wurde also durch die nachträgliche Zugabe von 0,2 g brenztraubensaurem Natrium nicht verändert.

Versuch 4.

3 Stunden mazerierter Rohsaft wurde mit der Hälfte seines Volumens mit Methanol versetzt. Hierauf gab ich 0,3 mol. Essigsäure zu und zwar auf je 10 ccm Flüssigkeit 2 ccm Essigsäure. Die Trokkenhefe rührte ich nur mit der eineinhalbfachen Menge Wasser an. Die restlichen eineinhalb Teile Wasser fügte ich erst vor dem Zentrifugieren hinzu.

Es wurde eine Reihe mit 0,1 g und eine Reihe mit 1 g brenztraubensaurem Natrium gemessen.

Reihe I. (0,1 g brenztraubensaures Natrium). Versuchsdauer: 5 Stunden. Es wurden 356 ccmm CO_2 gebildet und 7,7 mg Nickeldimethylglyoxim = 4,7 mg Acetoin entstand.

CQ = 0,34

Reihe II. (1 g brenztraubensaures Natrium). Versuchsdauer: 5 Stunden. Es wurden 254 ccmm CO_2 entwickelt und 1,8 mg Nickeldimethylglyoxim = 1,1 mg Acetoin gebildet.

CQ = 0,11

Bei größerer Brenztraubensäurekonzentration ist die Acetoinausbeute kleiner.

Versuch 5.

Von 3 Stunden bei 30° im Thermostaten mazeriertem mit Essigsäure und Methanol behandeltem Rohsaft wurde eine Versuchsreihe mit 0,1 g brenztraubensaurem Natrium und eine zweite Reihe mit 0,1 g brenztraubensaurem Natrium gemessen, bei der nachträglich vor dem Destillieren noch 0,2 g brenztraubensaures Natrium zugesetzt wurden.

Reihe I. (0,1 g brenztraubensaures Natrium). Versuchsdauer: 3 ½ Stunden. Es wurden 180 ccmm CO_2 gebildet und es entstand 2 mg Acetoin.

$$CQ = 0{,}28$$

Reihe II. (0,1 g brenztraubensaures Natrium). Versuchsdauer: 4 ½ Stunden. Es wurden 220 ccmm CO_2 gebildet und die Acetoinausbeute betrug 2,5 mg.

$$CQ = 0{,}28$$

Der CQ Wert änderte sich durch die Zugabe von 0,2 g brenztraubensaurem Natrium vor dem Destillieren nicht. Das Acetoin wurde also durch die höhere Brenztraubensäurekonzentration nicht zersetzt.

Versuch 6.

Hierzu wurde 3 Stunden bei 30° mazerierter wie üblich mit Essigsäure und Methanol behandelter Rohsaft, der zur weiteren Reinigung 4 mal mit Kaolin adsorbiert worden war, benutzt. Beim ersten und zweiten Male wurde mit 0,6 g Kaolin auf 10 ccm Rohsaft, und beim dritten und vierten Mal mit 0,8 g Kaolin auf 10 ccm Rohsaft adsorbiert. Zwischen den einzelnen Adsorptionen brachte ich den Saft jedes Mal wieder in die Kühlmaschine. Hierbei setzte sich nach einigen Stunden eine Eiweißfällung ab, die ich vor jeder neuen Adsorption abzentrifugierte. Nach der vierten Kaolinadsorption fiel sogar nach längerem Stehen bei —22° kein Eiweiß mehr aus. Es wurde eine Versuchsreihe mit 0,1 g brenztraubensaurem Natrium gemessen.

Versuchsdauer: 3 ½ Stunden. Es wurden 429 ccmm CO_2 entwickelt und 5,2 mg (= 3,2 mg Acetoin) Nickeldimethylglyoxim gebildet.

$$CQ = 0{,}19$$

Versuch 7.

Es wurde der gleiche Rohsaft wie beim vorigen Versuch 4 mal an Kaolin adsorbiert. Für die beiden ersten Adsorptionen benutzte ich 0,6 g Kaolin auf 10 ccm Rohsaft und für die zwei nächsten Adsorptionen 0,8 g Kaolin auf je 10 ccm Rohsaft. Zwischen den einzelnen Adsorptionen wurde der Saft wieder in die Kältemaschine gebracht, wobei bei längerem Stehen jedesmal eine Eiweißfällung erfolgte, die ich vor der weiteren Adsorption abschleuderte. Es wurde eine Versuchsreihe mit 0,1 g brenztraubensaurem Natrium gemessen.

Versuchsdauer: 5 1/4 Stunden. Es bildeten sich 369 ccmm CO_2 und 4,8 mg Nickeldimethylglyoxim = 2,9 mg Acetoin.

$$CQ = 0{,}20$$

Versuch 8.

3 Stunden bei 30° mazerierter Rohsaft wurde mit der Hälfte seines Volumens mit Methanol versetzt. Hierauf gab ich 0,3 mol. Essigsäure zu und zwar 2 ccm auf je 10 ccm Flüssigkeit. Darauf reinigte ich ihn auf die gleiche Weise wie im vorigen Versuch weiter (4 Kaolinadsorptionen, die 1. mit 0,6; 2. mit 0,6; 3. mit 0,8; 4. mit 0,8 g Kaolin auf je 10 ccm Saft). Es wurde eine Versuchsreihe mit 0,1 g brenztraubensaurem Natrium gemessen.

Versuchsdauer: 4 1/2 Stunden. Es wurden 475 ccmm CO_2 entwickelt und 5,2 mg Nickeldimethylglyoxim = 3,2 mg Acetoin gebildet.

$$CQ = 0{,}17$$

Versuch 9. Wrede: 143[29]).

5 Stunden bei 30° mazerierter Rohsaft wurde mit der Hälfte seines Volumens mit Methanol versetzt. Hierauf gab ich 0,3 mol. Essigsäure zu und zwar 2 ccm auf je 10 ccm Flüssigkeit. Die Trokkenhefe rührte ich mit der eineinhalbfachen Gewichtsmenge 30° warmen Wassers zu einem Brei an. Vor dem Zentrifugieren wurde noch die gleiche Menge Wasser (die eineinhalbfache Gewichtsmenge der Trockenhefe) zugesetzt. Das durch die Essigsäure und das Methanol

[29]) Bei diesem und bei den folgenden mit Namen und Versuchsnummer bezeichneten Messungen wurden mir die Fermentsäfte freundlicherweise von Herrn Wrede zur Verfügung gestellt.

gefällte Eiweiß zentrifugierte ich nach 1 stündigem Stehen bei —22°. Dann wurde der Saft 4 mal an Kaolin adsorbiert. Nach mehrtägigem Stehen bei —20° erfolgte keine Ausfällung von Eiweiß mehr. 50 ccm dieses kaolinadsorbierten Saftes schüttelte ich mit 20 ccm Tonerde B[30]) einige Zeit lang und ließ ihn dann 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Dann wurde zentrifugiert und der überstehende Saft abgegossen. Das Adsorbat wusch ich dreimal mit je 40 ccm gekühltem 30%igem Methanol und suspendierte es in 40 ccm 50%igem Glyzerin. Um das Adsorbat fein zu verteilen verrührte ich es vor dem Zentrifugieren mit kleinen Glasperlen. Dieses Adsorbat wurde dann in der üblichen Weise gemessen, nur schüttelte ich das 100 ccm Meßkölbchen bei der Messung mit.

Versuchsdauer: 3 Stunden. Es wurde eine Versuchsreihe mit 0,1 g brenztraubensaurem Natrium gemessen. 391 ccmm CO_2 bildeten sich und es entstand 2,2 mg Nickeldimethylglyoxim = 1,3 mg Acetoin.

$$CQ = 0{,}9$$

Der geringe CQ Wert ist wahrscheinlich durch den Verteilungszustand bedingt.

Versuch 10. Wrede: 143/145.

20 ccm des vorhin erwähnten Adsorbates eluierte ich mit 4 ccm gesättigter Na_2HPO_4-Lösung 4 Stunden lang bei —20°. Dann wurde in der üblichen Weise gemessen (0,1 g brenztraubensaures Natrium).

Versuchsdauer: 25 Stunden. Es wurden 214,5 ccmm CO_2 entwickelt und 2,8 mg Nickeldimethylglyoxim = 1,7 mg Acetoin gebildet.

$$CQ = 0{,}20$$

Versuch 11. Wrede 143.

5 Stunden bei 30° mazerierter mit Essigsäure und Methanol behandelter Rohsaft. Die Trockenhefe war mit der eineinhalbfachen Menge 30° warmen Wassers zu einem dicken Brei angerührt worden. Vor dem Zentrifugieren wurde die restliche Menge Wasser (eineinhalbfache Gewichtsmenge der Trockenhefe) hinzugefügt. Das durch Essigsäure und Methanol gefällte Eiweiß zentrifugierte ich nach 1 stündigem Stehen bei —22° ab. Nach mehrtägigem Stehen bei —22° erfolgte keine Eiweißausfällung mehr, nachdem 4 mal

[30]) 13,6 mg Al_2O_3 pro ccm.

an Kaolin adsorbiert worden war. Dieser 4 mal kaolinadsorbierte Saft wurde 3 mal an Tonerde adsorbiert. Zunächst wurde eine Tonerdevoradsorption mit 0,5 ccm Tonerde B auf 10 ccm Saft, dann eine Adsorption mit 0,25 ccm Tonerde B auf 10 ccm Saft und endlich eine Adsorption mit 4 ccm Tonerde B auf 10 ccm Saft ausgeführt. Den überstehenden Saft goß ich jedesmal ab. Nach einer dreimaligen Waschung mit 50%igem Methanol wurde das Adsorbat in einer 50%igen Glyzerinlösung suspendiert und in der üblichen Weise gemessen (0,1 g brenztraubensaures Natrium). Der 100 ccm Meßkolben wurde in dem Thermostaten mitgeschüttelt.

Versuchsdauer: 4 Stunden 40 Minuten. Es wurden 394 ccmm CO_2 und 1,8 mg Nickeldimethylglyoxim = 1,1 mg Acetoin gebildet.

CQ = 0,07

Auch hier ist der geringe CQ Wert wahrscheinlich durch den Verteilungszustand bedingt.

Versuch 12. Wrede 183.

Rohsaft 5 Stunden bei 30° mazeriert und mit Essigsäure und Methanol behandelt. Dann adsorbierte ich zweimal an 0,6 g Kaolin auf je 10 ccm Saft und zweimal an 0,8 g Kaolin auf 10 ccm Saft.

Der Saft wurde in einer Versuchsreihe mit 0,1 g brenztraubensaurem Natrium gemessen.

Versuchsdauer: 4 Stunden 45 Minuten. Es wurden 358,8 ccmm CO_2 und 3,6 mg Nickeldimethylglyoxim = 2,2 mg gebildet.

CQ = 0,156

Versuch 13. Wrede 188.

100 ccm des bei dem vorigen Versuche benutzten 4 mal an Kaolin adsorbierten Saftes versetzte ich nach Vorschrift von Herrn Wrede mit 25 ccm Tonerde B, schüttelte ihn 1 ½ Stunden bei Zimmertemperatur, dann wusch ich das Adsorbat nachdem zentrifugiert worden war, 3 mal mit 50 ccm 50 %igem Methanol und suspendierte es in 35 ccm 50%igem Glyzerin. Bei der anschließenden Acetoinbestimmung schüttelte ich das 100 ccm Meßkölbchen mit. (0,1 g brenztraubensaures Natrium)

Versuchsdauer: 4 Stunden 40 Minuten. Es wurden 343,9 ccm CO_2 und 3,6 mg Nickeldimethylglyoxim = 2,2 mg Acetoin gebildet.

CQ des Adsorbates = 0,163

Versuch 14. Wrede 188.

Der überstehende Saft vom Tonerdeadsorbat des vorigen Versuches wurde gleichfalls in der üblichen Weise gemessen (0,1 g brenztraubensaures Natrium).

Versuchsdauer: *22* Stunden 40 Minuten. Es wurden 142 ccmm CO_2 und 1,4 mg Nickeldimethylglyoxim = 0,85 mg Acetoin gebildet.

CQ des überstehenden Saftes = 0,153

Versuch 15.

5 Stunden bei 30° mazerierter mit Essigsäure und Methanol behandelter Rohsaft. Die Trockenhefe wurde mit der eineinhalbfachen Menge Wasser (30°) versetzt. Nach dem Mazerieren gab ich noch einmal die eineinhalbfache Menge Wasser zu. Das durch die Essigsäure und das Methanol ausgefällte Eiweiß zentrifugierte ich nach einstündigem Stehen bei —*22*° in der Kältemaschine ab. Hieran schlossen sich zwei Adsorptionen an 0,6 g Kaolin auf je 10 ccm Saft und zwei Adsorptionen an 0,8 g Kaolin auf je 10 ccm Saft an. Zwischen den einzelnen Adsorptionen setzte ich den Saft jedesmal wieder einige Stunden in der Kältemaschine einer Temperatur von —20° bis —*22*° aus, wobei jedesmal etwas Eiweiß ausfiel. 100 ccm dieses kaolinadsorbierten Saftes wurden mit 25 ccm methylalkoholischer Tonerde C[31]) versetzt, *22* Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt und dann zentrifugiert. Den überstehenden fast eiweißfreien Saft benutzte ich zu einer Acetoinbestimmung (0,1 g brenztraubensaures Natrium). Diese Messung führte ich mit 0,3 mol. Phosphatpuffer (ph = 6,4) aus, während ich bei den anderen Versuchen Acetatpuffer (0,3 mol. ph = 5,3) benutzte. Außerdem füllte ich bei dieser Messung 50 ccm Saft statt 25 ccm wie bisher in den 100ccm Meßkolben ein. Auch die Menge Eisen-III-chlorid im Destillierkolben wurde von 5 ccm auf 30 ccm heraufgesetzt.

Versuchsdauer: 4 Stunden 35 Minuten. Es wurden 320 ccmm CO_2 und 3,3 mg Nickeldimethylglyoxim = *2* mg Acetoin gebildet.

CQ = 0,149

[31]) 4,86 mg Al_2O_3 pro ccm.

Versuch 16. Wrede 203.

100 ccm des 4 mal kaolinadsorbierten Saftes „Wrede 83“ versetzte ich mit 25 ccm methanolischer Tonerde C und bewahrte sie 19 Stunden bei Zimmertemperatur unter öfterem Umschütteln auf. Dann dialysierte ich den überstehenden Saft nach dem Abzentrifugieren der Tonerde 8 Tage lang bei —20° gegen 30%iges Methanol. Diese Dialyse führte ich in einem zylindrischen mit Cellophan bespannten Glasgestänge aus. Das Dialysiergefäß hing in einem mit 30 %igem Methanol gefüllten Glaszylinder, der in der Kältemaschine stand. Das 30%ige Methanol erneuerte ich während der Dialysierzeit häufig. Nach 8 Tagen hatte sich am Boden der Dialysiertrommel ein feiner Niederschlag abgesetzt, den ich, nachdem die überstehende Flüssigkeit vorsichtig dekantiert worden war, mit etwa 20 ccm 30%igem Methanol aufrührte. Dann wurde zentrifugiert und die überstehende schwach eiweißhaltige Flüssigkeit in der üblichen Weise gemessen (0,1 g brenztraubensaures Natrium).

Versuchsdauer: 4 Stunden 30 Minuten. Es wurden 409 ccmm CO_2 und 8,7 mg Nickeldimethylglyoxim = 5,3 mg Acetoin gebildet. Für die Messung benutzte ich 20 ccm Saft. Die Acetoinbestimmung wurde mit 0,3 mol. Phosphatpuffer (ph = 6,4) ausgeführt. In den Destillierkolben gab ich wieder 30 ccm Eisen-III-chlorid wie beim vorigen Versuch.

$$CQ = 0{,}33$$

Versuch 17. Wrede: Versuch 208.

100 ccm des 4 mal kaolinadsorbierten Saftes 85 versetzte ich mit 25 ccm methanolischer Tonerde C und bewahrte sie unter öfterem Umschütteln 25 Stunden bei Zimmertemperatur auf. Dann wurde zentrifugiert. 100 ccm des überstehenden Saftes schüttelte ich 5 Minuten mit 10 g Kaolin. Dann wurde dieser Saft noch 1 ¼ Stunde bei Zimmertemperatur gehalten. Nach dem Zentrifugieren dialysierte ich diesen Saft wie im vorigen Versuche 6 Tage lang bei —20° gegen 30%iges Methanol. Nach 6 Tagen hatte sich auf dem Boden der Dialysiertrommel ein feiner Eiweißniederschlag abgesetzt; den überstehenden Saft dekantierte ich vorsichtig. Der geringe Rückstand wurde mit 20 ccm Wasser aufgerührt und zentrifugiert. Den nur Spuren von Eiweiß enthaltenden überstehenden Saft benutzte ich zu einer Carboligasemessung. Es wurde eine Versuchsreihe mit 0,1 g brenztraubensaurem Natrium (ohne Kochsaft) gemessen.

Versuchsdauer: 5 Stunden. Es wurden 366 ccmm CO_2 und 7,1 mg Nickeldimethylglyoxim = 4,3 mg Acetoin gebildet.

Die Acetoinbestimmung wurde mit 0,3 mol. Phosphatpuffer (ph = 6,4) ausgeführt.

CQ = 0,29

Versuch 18. Wrede 210.

100 ccm des 4 mal kaolinadsorbierten Saftes „Wrede 85" versetzte ich mit 25 ccm methanolischer Tonerde C und bewahrte sie 24 Stunden bei Zimmertemperatur auf. Nach dem Abzentrifugieren schaltete ich eine Kaolinadsorption ein. Nach einer Dialyse von 7 Wochen bei —20° dekantierte ich den über dem ausgefallenen Eiweiß stehenden inaktiven Saft. Das Eiweiß, das sich auf dem Boden des Dialysiergefäßes abgesetzt hatte, wurde in 30 ccm Wasser aufgerührt, zentrifugiert und der überstehende Saft gemessen (mit 0,1 g brenztraubensaurem Natrium ohne Kochsaft). [32])

Versuchsdauer: 3 Stunden 45 Minuten. Es wurden 344,5 ccmm CO_2 und 3,9 mg Nickeldimethylglyoxim = 2,4 mg Acetoin gebildet.

CQ = 0,18

Versuch 19. Wrede 210.

Der gleiche Versuch mit dem auf dieselbe Art wie im vorigen Versuch gereinigten Saft „Wrede 85", ebenfalls mit 0,3 mol. Acetatpuffer (ph = 5,3). Es wurde eine Versuchsreihe mit 0,1 g brenztraubensaurem Natrium ohne Kochsaft gemessen.

Versuchsdauer: 3 Stunden 35 Minuten. Es wurden 354,3 ccmm CO_2 und 3,2 mg Nickeldimethylglyoxim = 2 mg Acetoin gebildet.

CQ = 0,14

Versuch 20. Wrede 210.

Der gleiche Versuch wie der vorige Versuch mit dem gleichen Saft (Wrede 85), der genau so gereinigt worden war, wie es in den beiden vorigen Versuchen beschrieben ist. Diesmal wurde nur statt 0,1 g brenztraubensaurem Natrium 1 g brenztraubensaures Natrium zur Messung benutzt.

[32]) Es wurde hierzu 0,3 mol. Acetatpuffer (ph = 5,3) benutzt.

Versuchsdauer: 5 Stunden 45 Minuten. Es wurden 384,2 ccmm CO_2 und 1,2 mg Nickeldimethylglyoxim = 0,7 mg Acetoin gebildet.

CQ = 0,05

Der CQ Wert verringert sich wieder bei steigender Brenztraubensäurekonzentration.

Versuch 21. Wrede 214.

5 Stunden bei 30° mazerierter mit Essigsäure und Methanol behandelter Rohsaft, den ich zweimal an 0,6 g Kaolin auf 10 ccm Flüssigkeit adsorbierte. 500 ccm dieses kaolinadsorbierten Saftes versetzte ich nun mit 150 ccm Tonerde B. Nachdem ich diese Suspension 2 Tage lang bei —20° in der Kältemaschine aufbewahrt hatte, zentrifugierte ich die Tonerde ab. 100 ccm des überstehenden Saftes dialysierte ich 3 Tage bei —20°. Das Eiweiß, das sich auf dem Boden der Dialysiertrommel abgesetzt hatte, rührte ich, nachdem der überstehende Saft vorsichtig dekantiert worden war, mit 30 ccm Wasser auf. Die entstandene trübe Lösung wurde zentrifugiert und der klare Saft mit 0,1 g brenztraubensaurem Natrium ohne Kochsaft gemessen (0,3 mol. Acetatpuffer ph = 5,3).

Versuchsdauer: 21 Stunden 20 Minuten. Es wurden 249,6 ccmm CO_2 und 2,2 mg Nickeldimethylglyoxim = 1,3 mg Acetoin gebildet.

CQ = 0,137

Die vorstehende Arbeit wurde im Chemischen Institut der Universität Münster von Januar 1933 bis August 1934 ausgeführt.

Herrn Professor Dr. Langenbeck, unter dessen Leitung die Arbeit entstand, bin ich für seine allzeit bereite Unterstützung zu großem Dank verpflichtet.

Lebenslauf.

Ich bin am 16. 1. 1909 zu Nordhorn bei Gütersloh als Sohn des Justizoberrentmeisters Gottfried Schlockermann geboren. Die Elementarschule besuchte ich in Hamm in Westf. Seit Ostern 1918 war ich Schüler der Städtischen Oberrealschule zu Hamm i. W., die ich März 1928 mit dem Reifezeugnis verließ. Dem Studium der Naturwissenschaften, besonders der Chemie widmete ich mich in Münster i. W. Dort bestand ich im Sommersemester 1931 das erste und im Wintersemester 1932/33 das zweite Verbandsexamen.